

УДК 541.13.620.193.8

РОЛЬ ЭКЗОПОЛИМЕРНОГО КОМПЛЕКСА В ФОРМИРОВАНИИ БИОПЛЕНКИ НА ПОВЕРХНОСТИ СТАЛИ КОРРОЗИОННО-АГРЕССИВНЫМИ БАКТЕРИЯМИ

© 2012 г. Л. М. Пуриш, Л. Г. Асауленко, Д. Р. Абдулина, В. Н. Васильев, Г. А. Иутинская

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев, Д 03680

e-mail: purish@serv.imv.kiev.ua

Поступила в редакцию 15.06.2011 г.

Исследован состав экзополимерных комплексов (ЭПК), синтезируемых монокультурами *Desulfovibrio* sp. 10, *Bacillus subtilis* 36, *Pseudomonas aeruginosa* 27 и микробными ассоциациями, принимающими участие в коррозии металлических поверхностей. Методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ) проведен анализ моносахаридного состава углеводных компонентов и жирнокислотного состава липидной части ЭПК. Установлено, что в условиях биопленки бактерии синтезировали полимеры, в которых преобладала глюкоза, а при росте в суспензии отмечено высокое содержание рамнозы. В составе ЭПК *B. subtilis* 36, *P. aeruginosa* 27 выявлены гексурановые кислоты и гексозамины. Обнаружены качественные отличия жирнокислотного состава экзополимеров в биопленке и в бактериальной суспензии. Показано, что при переходе к биопленочной форме роста, степень ненасыщенности жирных кислот в экзополимерах ассоциативных культур возросла. Полученные результаты могут быть использованы для разработки методов борьбы с микробной коррозией металлических поверхностей.

Исследования последних десятилетий показали, что в природных экосистемах большинство бактерий существуют в виде специфически организованных биопленок, прикрепленных к субстратам [1–3]. Биопленки представляют собой высокоорганизованное, структурированное сообщество, создаваемое бактериями одного или нескольких видов [3, 4]. Микробное сообщество функционирует в биопленке как скоординированный консорциум, погруженный в экзополимерный матрикс синтезированных им внеклеточных компонентов: полисахариды, липиды, белки, нуклеиновые кислоты и другие вещества [4–6]. Экзополимеры бактерий играют важную роль не только в формировании структуры биопленки, но и во взаимодействии биопленки с поверхностью, на которой она развивается. Образование биопленки всегда сопровождается модификацией поверхности и изменениями свойств бактерий в сообществе [2, 6].

Развитие и функционирование микробных сообществ в биопленке не всегда учитывается должным образом при оценке их роли в окружающей среде, особенно в местах, подвергаемых антропогенному воздействию. Такими, в частности, являются зоны прокладки подземных коммуникаций: тепломагистралей, нефте- и газопроводов.

Ранее нами было показано, что в грунте, который непосредственно соприкасается с поверхностью трубопроводов, формируется сульфидогенное микробное сообщество, способствующее воз-

никновению очагов биокоррозии [7]. Основную роль в микробной коррозии стали играют сульфатредуцирующие бактерии, которые принимают непосредственное участие в биоэлектрострохимическом процессе, протекающем на поверхности металла, в биопленке [7–9]. Нами установлено, что наряду с сульфатредукторами, доминантными представителями такого сульфидогенного сообщества являются бактерии родов *Bacillus* и *Pseudomonas* [10].

Однако, несмотря на многочисленные работы, посвященные исследованиям биопленок, в настоящее время в литературе мало сведений о формировании биопленки на стали коррозионно-агрессивным микробным сообществом и роли экзополимерного комплекса в коррозионном процессе.

Цель работы – изучение состава экзополимерного комплекса, синтезированного моно- и ассоциативными культурами, выделенными из естественного сульфидогенного сообщества, и определение роли его доминантных представителей в формировании биопленки на поверхности стали.

МЕТОДИКА

Объекты исследования. В работе использованы бактерии *Desulfovibrio* sp. 10, *Bacillus subtilis* 36 и *Pseudomonas aeruginosa* 27, выделенные нами из биопленки, сформированной на стали-3 [10], а также искусственно созданная из вышеуказанных монокультур ассоциация. Для создания ассо-

циации использовали выращенные на жидкой среде Постгейта "В" [11] культуры бактерий *Desulfovibrio* sp. 10, *B. subtilis* 36 и *P. aeruginosa* 27 в экспоненциальной фазе роста. Суспензии бактерий смешивали в соотношении 1 : 1 : 1. Параллельно на среде Постгейта "В" выращивали естественную сульфидогенную ассоциацию бактерий, выделенную нами ранее из грунта, отобранного на поверхности трубы действующего газопровода в Карпатах.

Изучение развития бактерий в бактериальной суспензии и биопленке, образованной на стальных пластинах, проводили в условиях лабораторного опыта. Исследования проводили во флаконах объемом 500 мл, заполненных питательной средой Постгейта "В", инокулированной в зависимости от варианта опыта одной или несколькими культурами бактерий в экспоненциальной фазе роста. Количество посевного материала составляло 10% от объема среды, начальный титр монокультур — 10^7 кл./мл. Во флаконы погружали подвешенные на леске образцы стали-3 размером $4.8 \times 1.5 \times 0.5$ см, предварительно взвешенные, простерилизованные и обработанные 6 н. H_2SO_4 для снятия оксидных пленок и активизации электрохимических процессов [12]. Затем флаконы герметически закрывали резиновыми пробками и инкубировали при $28^\circ C$ в течение 90 сут. Каждый опыт ставили в 3 повторностях. Показателем развития бактерий было накопление биомассы (по белку) и сероводорода. Содержание клеточного белка определяли по методу Лоури. Для этого клетки биопленки и суспензии разрушали ультразвуком 2 мин трижды с интервалом 1 мин на приборе УЗДН-2Т (СССР). Центрифугировали для осаждения клеточных стенок при 7000 г 30 мин, сливали надосадочную жидкость и измеряли в ней содержание белка. Накопление сероводорода в среде определяли методом йодометрического титрования [13].

Выделение экзополимерного комплекса (ЭПК).

Для выделения экзополимеров, продуцируемых клетками биопленки, образцы стали-3 извлекали из культуральной среды и погружали в 100 мл 0.1 М фосфатного буфера (рН 7.0). Биопленку снимали с образцов ультразвуком при 22 кГц (30 с), обработку проводили дважды с интервалом 30 с на приборе УЗДН-2Т (СССР). Полученную суспензию центрифугировали при 15000 г и $20^\circ C$ в течение 40 мин для отделения клеток. Надосадочную жидкость диализировали в дистиллированной воде 3 сут [14]. Полученные диализаты упаривали на роторном испарителе ("Heidolph", Германия) до 50 мл для концентрирования раствора экзополимеров, затем лиофилизировали. В осажденных после центрифугирования клетках определяли количество белка, как описано выше. После удаления биопленки образцы стали обрабатывали раство-

ром для снятия продуктов коррозии следующего состава: серная кислота 84 г, лимоннокислый аммоний двузамещенный 100 г, тиомочевина 10 г, вода дистиллированная 880 мл. Срок экспозиции 10–40 мин, затем образцы промывали дистиллированной водой, высушивали фильтровальной бумагой и взвешивали. О коррозионной агрессивности бактерий судили по уменьшению массы стали по сравнению с исходной на единицу площади поверхности пластины в единицу времени [12].

Экзополимерный комплекс, продуцируемый клетками в суспензии, выделяли из супернатанта после центрифугирования при 15000 г и $20^\circ C$, 40 мин, как описано выше.

Моносахаридный состав ЭПК. Определение проводили методом газожидкостной хроматографии. Для анализа образцы предварительно обрабатывали, согласно процедуре [15]. К 2 мг лиофилизированного препарата добавляли 0.4 мл 2 н. HCl. Полученную смесь ЭПК запаивали в ампулу, затем проводили гидролиз в течение 4–5 ч при $100^\circ C$. Гидролизат упаривали досуха и трижды промывали дистиллированной водой на роторном испарителе при $45\text{--}50^\circ C$. Пробу ресуспендировали в 1 мл дистиллированной воды и добавляли боргидрид натрия. Образцы оставляли в темном месте на 12 ч, затем пробы нейтрализовали с помощью катионита КУ-2 в H^+ -форме. Катионит удаляли фильтрованием на стеклянном фильтре № 4 с размером пор 5–15 мкм, фильтрат упаривали досуха, трижды промывали метанолом, упаривали на роторном испарителе при комнатной температуре и добавляли 0.5 мл пиридина и 0.5 мл уксусного ангидрида, выдерживали при $100^\circ C$ 15 мин. Полученную смесь упаривали досуха в несколько этапов, добавляя метанол и дистиллированную воду. Образцы ресуспендировали в 2–3 мл хлороформа и центрифугировали при 5000 г 20 мин. Супернатант упаривали досуха.

Анализ полученных производных нейтральных моносахаридов в виде их полных ацетатов полиолов проводили на газовом хроматографе 6890N с масс-спектрометрическим детектором 5973 inert ("Agilent Technologies", США). Колонка капиллярная DB-225ms (J&W Scientific) 30 м \times 0.25 мм \times 0.25 мкм. Хроматографическое разделение проводили в изотермическом режиме при $220^\circ C$, газ-носитель — гелий, скорость потока через колонку — 1.0 мл/мин. Температура испарителя $250^\circ C$, ввод пробы с разделением потока 1 : 100, температура ГХ-МС интерфейса $280^\circ C$. Детекцию проводили в режиме сканирования в диапазоне 100–600 m/z.

Определение кислых и нейтральных моносахаридов проводили в виде их ацетилированных метилгликозидов, которые анализировали на колонке HP-5MS по следующей температурной

Таблица 1. Метаболическая и коррозионная активность монокультур бактерий и сообществ

Культура бактерий	Белок в клетках, мкг/мл		Накопление сероводорода, мг/л	Скорость коррозии, г м ² ч ⁻¹
	био пленка	суспензия		
Ассоциация естественная	1720	159	332 ± 5.1	0.239 ± 0.01
Ассоциация искусственная	1800	100	286 ± 4.8	0.178 ± 0.003
<i>Desulfovibrio</i> sp. 10	1880	200	291 ± 4.4	0.307 ± 0.01
<i>P. aeruginosa</i> 27	75	690	48 ± 2.3	0.086 ± 0.0035
<i>B. subtilis</i> 36	48	485	23 ± 0.6	0.072 ± 0.0022

программе: 150°C – 5 мин, от 150 до 250°C – по 3°C за 1 мин, 250°C – 10 мин [16].

Определение жирнокислотного состава липидной части ЭПК. К лиофильно высушенному ЭПК (5–10 мг) добавляли 1.5 мл смеси хлористого метилена и метанола (2 : 1), после интенсивного встряхивания оставляли на 12 ч. Далее добавляли 2 мл воды, встряхивали 10 мин, оставляли до расслоения фаз и отбирали нижнюю фазу (0.5 мл), которую переносили в ампулу емкостью 5 мл, упаривали досуха на роторном испарителе при 40°C, высушивали 2 ч в вакуумном эксикаторе над КОН, добавляли 1 мл 4 М HCl в метаноле, ампулу запаивали, оставляли на 4 ч при 80°C, переносили в колбочку и упаривали досуха, второй раз с 2 мл метанола. К полученному сухому остатку добавляли 1 мл насыщенного раствора хлорида натрия в воде и дважды, хорошо перемешивая, экстрагировали 2 мл хлороформа. Нижнюю фазу отбирали и упаривали досуха. Добавляли 1.5 мл гексана, образец переносили в емкость для анализа. ГЖХ-МС-анализ проводили на капиллярной колонке HP-5 MS с 5% фенилметилсилоксана, размером 30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм, при 150–210°C (4°C/мин), газ-носитель – гелий, скорость потока – 1 мл/мин, хроматограф 6890N с масс-спектрометрическим детектором 5973 inert (“Agilent Technologies”, США) [17].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В естественных условиях наиболее коррозионноагрессивные сульфатредуцирующие бактерии, как правило, развиваются в микробном сообществе, каждый член которого может играть определенную роль в формировании биопленки [7–9]. Исходя из этого факта, наши исследования были сосредоточены на изучении формирования биопленки как сульфидогенным сообществом, так и монокультурами *Desulfovibrio* sp. 10, *B. subtilis* 36 и *P. aeruginosa* 27, постоянными компонентами сообщества.

Визуальные наблюдения показали, что после экспозиции в питательной среде с бактериями на поверхности образцов стали образовывалась биопленка. О развитии бактерий судили по на-

коплению биомассы как в среде, так и в биопленке (табл. 1). Установлено, что сульфидогенные ассоциации и монокультура *Desulfovibrio* sp. 10 значительно лучше развивались в биопленке. По окончании экспозиции определение клеточного белка показало, что в биопленке его было на порядок больше, по сравнению с суспензией. Значительное накопление биомассы в биопленке, возможно, связано со способностью сульфатредуцирующих бактерий к позитивному хемотаксису к железу [7]. Кроме того, присутствие на поверхности субстрата катионов Fe³⁺ значительно увеличивает количество адгезированных анаэробных бактерий *Desulfovibrio* sp. [3]. Именно хемотаксис к Fe³⁺ и адгезия на поверхности металла способствуют концентрации этих бактерий в специфической эконише, где вследствие электрохимических процессов происходит накопление ионов металлов и формируется коррозионно-агрессивное микробное сообщество. Гетеротрофные спутники сульфатредукторов *B. subtilis* 36 и *P. aeruginosa* 27 синтезировали значительно меньше белка в биопленке, но при этом существенно возросло накопление их биомассы в суспензии.

Свидетельством развития бактерий, а также их коррозионной агрессивности было продуцирование сероводорода. При культивировании сульфидогенных ассоциаций и *Desulfovibrio* sp. 10 количество сероводорода составляло 286–332 мг/л. Накопление сероводорода коррелировало с коррозионным разрушением стальных образцов, которое в монокультуре *Desulfovibrio* sp. 10 достигало 0.307 г м² ч⁻¹. Это доказывает, что сероводород, образованный при восстановлении серы сульфатов из среды (S⁺⁶ → S⁻²), может принимать непосредственное участие в коррозионном процессе. Взаимодействие сероводорода с ионами железа приводит к образованию сульфида железа, который служит дополнительным катодом, усиливающим электрохимические процессы [9, 18]. В культуральной среде с *P. aeruginosa* 27 и *B. subtilis* 36 выявлено незначительное количество сероводорода и низкая коррозионная активность. Скорость коррозии в присутствии этих бактерий была в 2–4.3 раза ниже, чем при участии сульфатредукторов.

Коррозионная агрессивность микробного сообщества определяется способностью сформированной им биопленки катализировать электрохимические процессы на поверхности металла, которые вызывают его разрушение [19, 20]. Важным фактором коррозии в зоне взаимодействия биопленки с металлом является экзополимерный матрикс, в который погружены бактерии и синтезируемые ими внеклеточные полимеры, так называемый экзополимерный комплекс (ЭПК) [8, 20]. Однако роль компонентов ЭПК в общей картине биокоррозии в настоящее время четко не определена. Известно, что доминирующим компонентом экзополимерного комплекса являются экзополисахариды, играющие ключевую роль в адгезии и формировании структуры биопленки [2, 6]. При взаимодействии бактерий с корродируемым металлом продуцируемые экзополисахариды, благодаря своим полианионным свойствам, способствуют закреплению в биопленке продуктов коррозии [20]. С другой стороны, есть данные, что экзополисахариды некоторых бактерий способны образовывать на поверхности металла плотную пленку, которая может существенно угнетать коррозионный процесс [21]. Целесообразно провести сравнительное исследование синтеза углеводных компонентов ЭПК моно- и ассоциативными культурами бактерий при разных моделях роста: в биопленке и среде.

Нами установлено, что состав углеводных компонентов ЭПК различался в зависимости от вида продуцирующих его бактерий и модели роста.

Характерным для экзополимерного комплекса как биопленки, так и суспензии клеток было наличие в моносахаридном составе нейтральных углеводов — глюкозы, галактозы, маннозы, рамнозы, фукозы и ксилозы. В биопленке, сформированной естественной сульфидогенной ассоциацией и монокультурами *P. aeruginosa* 27, *B. subtilis* 36, кроме вышеуказанных углеводов, обнаружены рибоза и арабиноза. Последние синтезировались также суспензионными клетками *Desulfovibrio* sp. 10 (табл. 2).

В моносахаридном составе экзополимеров биопленки доминировала глюкоза, количество которой достигало 25.2–36.4%. Структура матрикса биопленки стабилизируется в основном за счет полисахаридов, мономерами которых чаще всего являются гексозы, в частности глюкоза [6, 21].

В составе экзополимерного комплекса в среде также преобладала глюкоза, ее содержание колебалось от 17.5 до 31.4%. В среде отмечено более высокое по сравнению с биопленкой содержание рамнозы, которая может находиться в составе ЭПК в виде остатков рамнозы в полисахариде, гликопротеине, гликолипиде. Больше всего рамнозы (до 24%), характерного компонента гликолипидов, продуцировали культуры гетеротрофов *P. aeruginosa* 27, *B. subtilis* 36 при стационарном вы-

ращивании. Эти бактерии являются продуцентами рамнолипидов, которые в структуре биопленки могут играть значительную роль в ее формировании [22]. Такое предположение подтверждается исследованиями синтеза рамнолипидов в биопленке *P. aeruginosa*. Авторами [23] было показано, что продуцирование рамнолипидов *P. aeruginosa* необходимо для предотвращения плотного прикрепления и слипания бактерий внутри биопленки, что способствует формированию каналов, по которым в биопленке циркулируют кислород и продукты метаболизма.

Согласно исследованиям [6, 20], структура биопленки в значительной степени зависит от содержания в составе полисахаридов моносахаридных звеньев, обладающих зарядом, а именно урновых кислот (галактуроновая, глюкуроновая), а также аminosахаров (галактозамин и глюкозамин). Поэтому мы обратили внимание на содержание в экзополимерном комплексе именно этих мономеров. Наибольшее разнообразие урновых кислот и аminosахаров выявлено в составе экзополимеров гетеротрофных спутников сульфатредукторов: *P. aeruginosa* 27, *B. subtilis* 36. В биопленке *P. aeruginosa* обнаружено в 4.6 и 1.6 раз больше урновых кислот и аminosахаров (соответственно), чем в суспензии бактерий. Галактозамин и глюкозамин обнаружены также в экзополимерах, синтезируемых ассоциативными культурами. В составе экзополимеров *Desulfovibrio* sp. 10 обнаружен только галактозамин. При сравнении моносахаридного состава ЭПК монокультур *Desulfovibrio* sp. 10, *P. aeruginosa* 27 и *B. subtilis* 36 очевидно, что именно гетеротрофные ассоциаты сульфатредуцирующих бактерий продуцировали полисахариды, в составе которых выявлен наибольший спектр нейтральных углеводов, а также урновых кислот и глюкозамин, которые, как известно, взаимодействуя с другими компонентами экзополимеров с помощью карбоксильных и аминок групп, способствуют формированию биопленки и укреплению ее структуры [2, 14]. Кроме того, синтезируемые бактериями полисахариды способны связывать ионы металлов и сульфиды в матриксе, активизируя коррозионный процесс [20].

В последние годы появились сведения о значительной роли в формировании и функционировании биопленки минорных компонентов экзополимерного комплекса, а именно липидов и жирных кислот [24–27]. Исследования ЭПК *Acidithiobacillus ferrooxidans* показали, что значительную его часть составляли жирные кислоты, которые, по мнению авторов [24], принимают участие в адгезии клеток к сульфидным минералам. При биосинтезе экзополимерного комплекса жирные кислоты способны ковалентно связываться с гидрофильными молекулами, образуя поверхностно-активные соединения: гликолипи-

Таблица 2. Моносахаридный состав экзополимерного комплекса монокультур и их сообществ при разных моделях роста

Культура бактерий	Мо-дель роста*	Моносахариды, %**												
		гексозы			дезоксигексозы		пентозы			гексуроновые кислоты		гексозамины		
		глюкоза	галактоза	манноза	рамноза	фукоза	ксилоза	рибоза	арабиноза	галактуро-новая	глюкуро-новая	галакто-замин	глюкоза-мин	
Ассоциация естественная	БП	33.41	8.79	9.51	8.20	14.56	2.62	2.20	1.67	—	—	—	10.40	4.79
	СБ	31.36	9.28	15.75	13.42	17.29	3.89	3.74	—	—	—	—	11.32	—
Ассоциация искусственная	БП	36.40	3.47	5.89	3.21	20.39	2.15	—	—	—	—	7.42	3.27	—
	СБ	19.63	17.99	16.81	8.77	14.46	3.32	4.22	—	—	—	—	14.73	1.32
<i>Desulfovibrio</i> sp. 10	БП	34.17	4.76	4.95	3.83	19.16	2.46	—	—	—	—	—	2.66	—
	СБ	25.19	17.41	26.99	9.76	5.92	2.31	2.90	1.24	—	—	—	8.40	—
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27	БП	33.03	9.33	11.49	7.50	17.02	2.63	0.57	0.23	3.03	4.17	10.07	9.28	10.07
	СБ	25.21	8.59	20.79	23.72	7.54	2.39	1.17	1.68	1.56	—	—	10.60	1.25
<i>Bacillus subtilis</i> 36	БП	25.19	6.50	6.79	14.76	18.21	2.92	2.33	1.39	8.42	1.44	—	5.66	—
	СБ	17.47	17.89	30.91	24.12	8.02	2.11	1.20	—	—	—	—	9.59	0.09

* БП – биопленка, СБ – суспензия бактерий, “—” не обнаружено углеводов.

** % от общей суммы площади пиков на хроматограмме.

Таблица 3. Жирнокислотный состав липидной части ЭПК биопленки

Жирная кислота*	Число атомов углерода	Ассоциация естественная	Ассоциация искусственная	<i>Desulfovibrio</i> sp. 10	<i>P. aeruginosa</i> 27	<i>B. subtilis</i> 36
Додекановая	C _{12:0}	1.76	1.55	1.35	1.77	1.99
β-гидрокси додекановая	C _{12:0-3-ОН}	1.75	1.33	1.64	3.98	0
Тетрадекановая	C _{14:0}	7.09	6.93	7.14	6.37	7.83
Пентадекановая	C _{15:0}	4.02	4.28	4.37	3.83	4.47
Антиизопентадекановая	Антиизо C _{15:0}	1.74	1.81	2.41	1.81	0
Гексадекановая	C _{16:0}	37.48	35.65	39.06	36.76	47.34
Гексадеценовая	C _{16:1}	10.17	12.35	12.19	11.71	7.44
Гептадекановая	C _{17:0}	1.29	1.45	1.18	1.48	0
Октадекановая	C _{18:0}	14.11	13.51	12.69	13.88	19.3
Октадеценовая	C _{18:1}	15.44	16.8	15.53	15.53	11.63
Октадиеновая	C _{18:2}	3.09	3.35	2.45	2.88	0
Докозановая	C _{22:0}	2.06	0.99	0	0	0
Степень ненасыщенности		0.32	0.36	0.33	0.33	0.19

* – % от общей суммы жирных кислот.

ды (рамнолипиды) и липопептиды. С одной стороны, их синтез позволяет бактериям адгезироваться на гидрофобных субстратах [25], с другой – эти соединения ответственны за важные этапы формирования специфической структуры биопленки, а именно в матриксе биопленки каналов, по которым происходит активный перенос кислорода, воды, растворенных питательных веществ, ингибиторов и других соединений [22, 26].

Учитывая вышесказанное, мы выделили липидную составляющую ЭПК моно- и ассоциативных культур и определили ее жирнокислотный состав.

В составе липидных компонентов, выделенных из экзополимеров биопленки и суспензии бактерий, обнаружены насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты. В биопленке преобладали насыщенные гексадекановая и октадекановая кислоты (табл. 3). Количество гексадекановой кислоты в ЭПК сульфидогенных ассоциаций, *Desulfovibrio* sp. 10 и *P. aeruginosa* 27 было в пределах 35.65–39.06%, октадекановой – 12.69–14.11%. В биопленке, образованной *B. subtilis* 36, количество упомянутых кислот было выше и составляло соответственно 47.34 и 19.3%. Следует отметить, что в жирнокислотном составе липидной части экзополимеров биопленки *B. subtilis* 36 отсутство-

вали β-гидроксидодекановая кислота, антиизопентадекановая, гептадекановая кислоты, которые были обнаружены в биопленке сульфидогенных ассоциаций, *Desulfovibrio* sp. 10 и *P. aeruginosa* 27. В биопленке выявлены также ненасыщенные гексадеценовая (10.17–12.35%), октадеценовая (11.63–16.8%) и октадиеновая кислоты (2.45–3.35%).

Обнаружены качественные отличия жирнокислотного состава липидной части ЭПК биопленки и суспензии бактерий. Так, в ЭПК, синтезированной бактериями в суспензии, не выявлены присутствующие в биопленке додекановая, гидрооксидодекановая, гептадекановая и докозановая кислоты. В то же время ЭПК, синтезируемый суспензионными клетками, содержал цис- и транс-октадеценовые кислоты, отсутствующие в ЭПК биопленки (табл. 4).

В липидной составляющей ЭПК как биопленки, так и суспензии идентифицированы и другие жирные кислоты, но их количество было незначительным. При этом в липидной части экзополимерного комплекса биопленки выявлены 12 жирных кислот, а в суспензии – 9. Следует подчеркнуть, что в биопленке было выше содержание ненасыщенных жирных кислот. Значение степени ненасыщенности при переходе от суспензион-

Таблица 4. Жирнокислотный состав липидной части ЭПК суспензии бактерий

Жирная кислота*	Число атомов углерода	Ассоциация естественная	Ассоциация искусственная	<i>Desulfovibrio</i> sp. 10	<i>P. aeruginosa</i> 27	<i>B. subtilis</i> 36
Тетрадекановая	C _{14:0}	20.8	0	2.39	1.37	5.27
Гидрокситетрадекановая	C _{14:3ОН}	2.88	3.32	1.53	1.77	0
Пентадекановая	C _{15:0}	0.5	0	0	0	1.59
Антиизопентадекановая	Антиизо C _{15:0}	1.03	0	0.9	1.45	4.67
Гексадекановая	C _{16:0}	27.25	33.82	27.25	31.49	40.93
Гексадеценовая	C _{16:1}	0.67	0	2.84	1.62	0
Октадекановая	C _{18:0}	42.06	34.7	30.03	30.45	27.7
Октадеценовая	C _{18:1цис}	15.9	20.7	22.67	19.03	17.55
Октадеценовая	C _{18:1транс}	7.6	7.46	12.38	12.81	2.29
Степень ненасыщенности		0.24	0.28	0.38	0.33	0.20

* – % от общей суммы жирных кислот.

ной к биопленочной форме роста отличалось. В микробных ассоциациях степень ненасыщенности жирных кислот в ЭПК биопленок существенно выше, чем в суспензии. Известно, что ненасыщенные жирные кислоты имеют большую реакционную способность и могут взаимодействовать с белками, полисахаридами и др. полимерами. Связывание липидов, в частности жирных кислот, может способствовать формированию каналов биопленки и усилению ее стабильности [22]. Кроме того, обсуждается роль некоторых жирных кислот в “quorum sensing” регуляции биопленок. В частности, цис-2-деценовая мононенасыщенная жирная кислота оказалась сигнальной молекулой, способной к индукции распада микроколоний биопленки. Среди внеклеточных жирных кислот бактерий возможно наличие и других сигнальных молекул [27].

Таким образом, продуцируемые коррозионно-агрессивными бактериями экзополимеры могут способствовать адгезионным, формообразующим и коммуникативным процессам, содействующим функционированию и формированию структуры биопленки.

Наши исследования роли экзополимерного комплекса в формировании биопленки на стали – начальный этап моделирования микробной коррозии в естественных условиях. Понимание фундаментальных и экологических механизмов функционирования биопленок позволит разработать новую стратегию управления по защите и

борьбы с ними, что будет способствовать созданию новых методов противокоррозионной защиты металлов от биокоррозионных повреждений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R., Lappin-Scott H.M. // Annu. Rev. Microbiol. 1995. V. 49. P. 711–745.
2. Lewandowski Z. Biofilms: Recent Advances in Their Study and Control / Ed L.V. Evans. Harwood: Academic Publishers, 2000. P. 1–17.
3. Watnick P., Kolter R. // J. Bacteriol. 2000. V. 182. № 10. P. 2675–2679.
4. Davey M.E., O'Toole G.A. // Microbiol. Molec. Biol. Rev. 2000. V. 64. № 4. P. 847–867.
5. Смирнова Т.А., Дибенко Л.В., Азизбекян Р.Р., Романова Ю.М. // Микробиология. 2010. Т. 79. № 4. С. 435–446.
6. Sutherland I.W. // Microbiology. 2001. V. 147. № 1. P. 3–9.
7. Андреюк Е.И., Козлова И.А., Контева Ж.П., Пиляшенко-Новохатный А.И., Занина В.В., Пуриш Л.М. Микробная коррозия подземных сооружений. К.: Наукова думка, 2005. 258 с.
8. Lee W., Lewandowski Z., Nielsen P.H., Hamilton W.A // Biofouling. 1995. V. 8. № 3. P. 165–194.
9. Hamilton W.A. // Annu. Rev. Microbiol. 1985. V. 39. P. 195–217.
10. Асауленко Л.Г., Абдулина Д.Р., Пуриш Л.М. // Микробиол. ж. 2009. Т. 72. № 4. С. 3–10.

11. Романенко В.И., Кузнецов С.И. Экология микроорганизмов пресных водоёмов. Л.: Наука, 1974. 194 с.
12. Коррозия: Справоч. изд. / Ред. Л.Л. Шраер. М.: Металлургия, 1981. 632 с.
13. Лурье Ю.Ю. Унифицированные методы анализа вод. М.: Химия, 1971. 194 с.
14. Beech I., Hanjagsit L., Kalaji M., Neal A., Zinkevich V. // *Microbiology*. 1999. V. 145. № 6. P. 1491–1497.
15. Albersheim P., Nevis D.J., English P.D., Karr A. // *Carbohydr. Res.* 1976. V. 5. № 3. P. 340–345.
16. Corsaro M.M., Lanzetta R., Parrilli E., Parrilli M., Tutino M.L. // *Eur. J Biochem.* 2001. V. 268. № 19. P. 5092–5097.
17. Варбанец Л.Д., Здоровенко Г.М., Книрель Ю.А. Методы исследования эндотоксинов. Киев: Наукова думка, 2006. 238 с.
18. Pérez E.J., Cabrera-Sierra R., González I., Ramírez-Vives F. // *Corrosion Sci.* 2007. V. 49. № 9. P. 3580–3597.
19. Kuhl M., Jorgensen B.B. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1992. V. 58. № 4. P. 1164–1174.
20. Beech I., Zinkevich V., Tapper R., Gubner R., Avci R. // *J. Microbiol. Methods*. 1999. V. 36. № 1–2. P. 3–10.
21. Christensen B.E. // *J. Biotechnol.* 1989. V. 10. № 3–4. P. 181–202.
22. Pamp S.J., Tolker-Nielsen T. // *J. Bacteriol.* 2007. V. 189. № 6. P. 2531–2539.
23. Davey M.E., Caiazza N.C., O'Toole G.A. // *J. Bacteriol.* 2003. V. 185. № 3. P. 1027–1036.
24. Kinzler K., Gehrke T., Telegdib J., Sand W. // *Hydrometallurgy*. 2003. V. 71. № 1–2. P. 83–88.
25. Satpute S.K., Banat I.M., Dhakephalkar P.K., Banpurkar A.G., Chopade B.A. // *Biotechnol. Adv.* 2010. V. 28. № 4. P. 436–450.
26. Abdel-Mawgoud A.M., Lepine F., Deziel E. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010. V. 86. № 5. P. 1323–1336.
27. Davies D.G., Marques C.N.H. // *J. Bacteriol.* 2009. V. 191. № 5. P. 1393–1403.

Role of Polymer Complexes in the Formation of Biofilms by Corrosive Bacteria on Steel Surfaces

L. M. Purish, L. G. Asaulenko, J. R. Abdulina, V. N. Vasil'ev, and G. A. Iutinskaya

Zabolotnii Institute of Microbiology and Virology, National

Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

e-mail: purish@serv.imv.kiev.ua

Received June 15, 2011

Abstract—The composition of exopolymer complexes (EPCs), synthesized by the monocultures *Desulfovibrio* sp. 10, *Bacillus subtilis* 36, and *Pseudomonas aeruginosa* 27 and by microbial associations involved in the corrosion of metal surfaces has been studied. An analysis of the monosaccharide composition of carbohydrate components, as well as the fatty acid composition of the lipid part of EPCs, was carried out by gas-liquid chromatography (GLC). It was found that bacteria in biofilms synthesized polymers; this process was dominated by glucose, while the growth of bacteria in a suspension was marked by a high rhamnose content. Hexouronic acids and hexosamine have been revealed as a part of *B. subtilis* 36 and *P. aeruginosa* 27 EPCs. Qualitative differences were revealed in the fatty acid composition of exopolymers in biofilms and in a bacterial suspension. It was shown that the transition to a biofilm form of growth led to an increase in the unsaturation degree of fatty acids in the exopolymers of associative cultures. The results can be used to develop methods to control microbial corrosion of metal surfaces.